

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12P 13/00, C12N 1/20 // (C12P 13/00, C12R 1:465) (C12N 1/20, C12R 1:465)	A1	(11) 国際公開番号 WO00/53792 (43) 国際公開日 2000年9月14日(14.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01101 (22) 国際出願日 1999年3月8日(08.03.99) (71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 社団法人 北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 大村 智(OMURA, Satoshi)[JP/JP] 供田 洋(TOMODA, Hiroshi)[JP/JP] 高橋洋子(TAKAHASHI, Yoko)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 社団法人 北里研究所内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 小林和憲(KOBAYASHI, Kazunori) 〒170-0004 東京都豊島区北大塚2丁目25番1号 太陽生命大塚ビル3階 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, PT, RU, SK, TR, US, YU, 歐州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: SUBSTANCES WK-5344A AND WK-5344B AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54)発明の名称 WK-5344A物質及びWK-5344B物質並びにそれらの製造法

(57) Abstract

Novel substances WK-5344A and WK-5344B having an effect of inhibiting cholesterol ester transfer protein; and a process for producing the same which comprises culturing a microorganism belonging to the genus Streptomyces and being capable of producing the substances WK-5344A and WK-5344B in a medium, thus accumulating the substances WK-5344A and WK-5344B in the culture and collecting the substances WK-5344A and WK-5344B therefrom. Because of showing a potent inhibitory activity on cholesterol ester transfer protein, these substances are useful in preventing and treating human diseases induced by the accumulation of cholesterol.

(57)要約

本発明はコレステリルエステル転送タンパク質阻害作用を有する新規物質、WK-5344A物質及びWK-5344B物質並びにそれらの製造法を得るものであり、ストレプトマイセス属に属し、WK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、その培養物中にWK-5344A物質及びWK-5344B物質を蓄積せしめ、該培養物からWK-5344A物質及びWK-5344B物質を採取する。本物質はコレステリルエステル転送タンパク質に対して著しい阻害活性を示すことから、ヒトのコレステロール蓄積に対する疾病の予防および治療に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スウェーデン
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニダッド・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴー	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ベトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーロースラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

WK-5344A物質及びWK-5344B物質並びにそれらの製造法

発明の属する技術分野

本発明はWK-5344A物質及びB物質並びにそれらの製造法に関する。更に詳しくいえば、コレステリルエステル転送タンパク質阻害作用を有する新規物質、WK-5344A物質及びWK-5344B物質並びにそれらの製造法に関する。

従来の技術

成人の高脂血症に起因する動脈効果など血管壁にコレステロールが蓄積することにもとづく心筋梗塞や脳卒中などに対し、コレステロール生合成阻害によるいくつかの予防治療剤は知られていた。例えばプラバスタチン、メビノリンやフラバスタチン(Endo, A.; Journal of Medicinal Chemistry 28巻、401~405ページ、1985年およびEndo, A.; Journal of Lipid Research 33巻、1569~1582ページ、1992年)が挙げられる。

発明が解決しようとする課題

しかしながら、心筋梗塞や脳卒中などの病態の発症は、複雑で複合的であることから作用メカニズムの異なる物質の発見が強く望まれていた。

特に近年、食生活の向上に伴い成人の高脂血症に起因する動脈硬化など血管壁にコレステロールが蓄積し、心筋梗塞や脳卒中などの疾病による脂肪原因が上昇し、現代病として問題視されている。血中ではコレステロールは主として長鎖脂肪酸によりエステル化され、コレステリルエステルとして低密度リポタンパク1や高密度リポタンパク質中に取り込まれて循環している。

肝臓から供給されるコレステロールを末梢組織へ輸送していく低密度リポタンパク質は動脈硬化を促進する危険因子であるのに対し、高密度リポタンパク質は逆に末梢神経からコレステロールを汲みだし、動脈硬化の進展を抑制する因子と考えられている。これらの両タンパク質間でコレステリルエステルの交換反応を司るのがコレステリルエステル転送タンパク質であり、低密度リポタンパク質の成熟化に関与している。

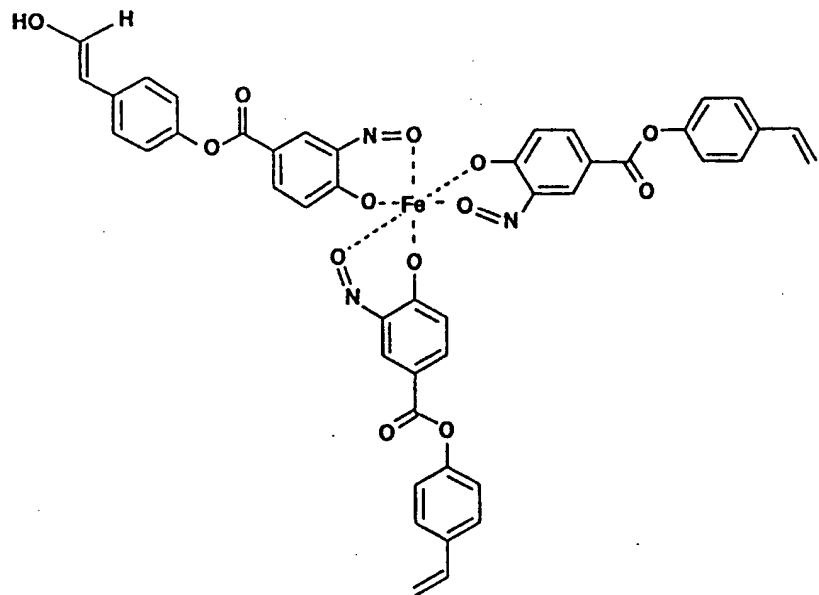
従って、このコレステリルエステル転送タンパク質の機能を阻害する物質は、血中において、動脈硬化の危険因子である低密度リポタンパク質量の低下、逆に動脈硬化を抑制する高密度リポタンパク質量の上昇による抗動脈硬化作用を惹起せしめ、かかる疾病に有効と推察される。

かかる実情において、コレステリルエステル転送タンパク質阻害活性を有する物質を提供することは、動脈硬化にもとづく心筋梗塞や脳卒中などの成人病の予防、治療上において極めて有用なことである。

課題を解決するための手段

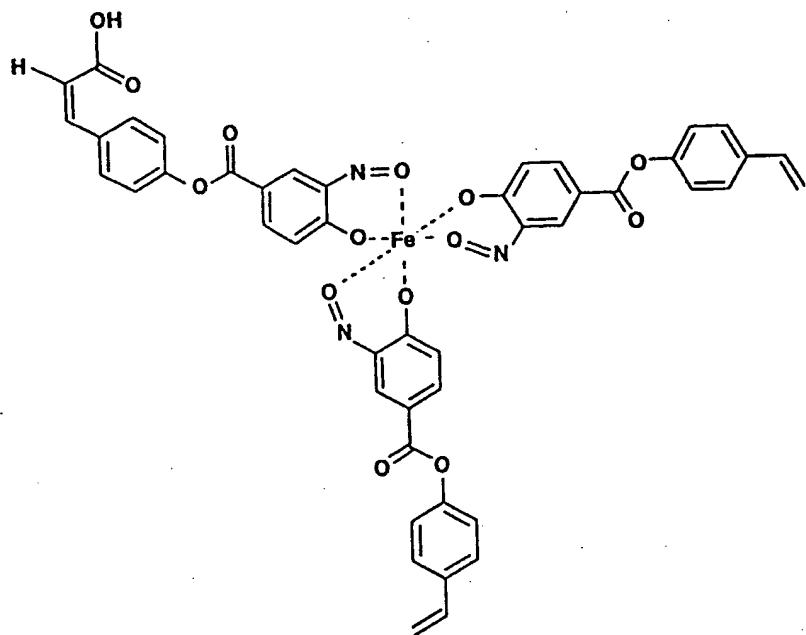
本発明者らは、新規な生理活性物質の探索を目的として種々の土壌から菌株を分離し、その生産する代謝産物について研究を続けた結果、新たに土壌から分離したWK-5344菌株の培養物中に、コレステリルエステル転送タンパク質阻害活性を有する物質が産生されることを見いだした。次いで、該培養物から該コレステリルエステル転送タンパク質阻害活性物質を分離、精製した結果、このような化学構造を有する物質は従来まったく知られていないことから、本物質をWK-5344A物質及びWK-5344B物質と称することにした。

本発明は、かかる知見にもとづいて完成されたものであって、下記式



で表される新規物質、WK-5344 A物質に関する。

本発明また、下記の式



で表される新規物質、WK-5344 B物質に関する。

本発明は更にまた、ストレプトマイセス属に属し、WK-5344 A物質及びWK-5344 B物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物にWK-5344 A物質及びWK-5344 B物質を蓄積せしめ、該培養物から

WK-5344A物質及びWK-5344B物質を採取する、新規物質WK-5344A物質及びWK-5344B物質あるいはそれらの塩の製造法に関する。本発明の好ましい実施態様によれば、ストレプトマイセス属に属し、WK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトマイセス エスピー (*Streptomyces sp.*) WK-5344である新規物質WK-5344A物質及びWK-5344B物質あるいはそれらの塩の製造法に関する。本発明は更にまた、ストレプトマイセス属に属し、WK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物に関し、該微生物が、ストレプトマイセス エスピー (*Streptomyces sp.*) WK-5344 (FERM BP-6668) である。

本発明のWK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物（以下、WK-5344物質生産菌と称する）は、ストレプトマイセス属に属するが、WK-5344A物質及びWK-5344B物質生産能を有するものであればよく、特に制限されることはない。本発明のWK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産するために使用される菌株の好適な一例としては、本発明者らによって新たに採取した土壌より分離されたストレプトマイセス エスピー (*Streptomyces sp.*) WK-5344株が挙げられる。

本菌株の菌学的性状を示すと以下の通りである。

(1) 形態的性質

栄養菌糸は各種寒天培地上でよく発達し、分断は観察されない。気菌糸はスター・無機寒天、グリセロール・アスパラギン寒天等で豊富に着生し、白色から灰色を呈する。顕微鏡下の観察では、気菌糸はらせん状を呈し、20ヶ以上の胞子の連鎖が認められる。胞子の形は卵型であり、その大きさは $1.0 \times 0.5 \mu\text{m}$ である。胞子の表面は、とげ状であった。菌核、胞子嚢および遊走子は見いだされない。

(2) 各種寒天培地上での培養性状

イー・ビー・シャーリング (E. B. Shirling) とデー・ゴットリ

ープ (D. Gottlieb) の方法 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムティック・バクテリオロジー、第 16 卷、第 313 頁、1966 年) によって調べた本生産菌の培養性状を第 1 表に示す。

色調は標準色として、カラー・ハーモニー・マニュアル第 4 版 (コンテナ・コーポレーション・オブ・アメリカ・シカゴ、1958 年) を用いて決定し、色標名とともに括弧内にそのコードを併せて記した。以下は特記しない限り、本菌を 27°C、2 週間目の各培地における肉眼的に観察した結果である。

第 1 表

シュークロース・ 硝酸寒天培地	生育 裏面	良好に生育、ライトマスタードタン (2 i e) ライトマスタードタン～モスグリーン (2 i e～241 g)
	気菌糸	豊富に着生、アッシュ (5 f e)
	可溶性色素	生産しない
グルコース・ アスパラギン寒天 培地 (ISP)	生育 裏面 気菌糸	良好に生育、バンブー (2 g c) バンブー (2 g c) 豊富に着生、アラバスター・ティント～ アッシュ (13 b a～5 f e)
	可溶性色素	パステルイエロー (1 d b)
グリセロール・ アスパラギン寒天 培地 (ISP)	生育 裏面 気菌糸	良好に生育、ビスケット (2 e c) バンブー (2 g c) 豊富に着生、アラバスター・ティント～ アッシュ (13 b a～5 f e)
	可溶性色素	パステルイエロー (1 d b)

スター・チ・ 無機塩寒天培地 (I S P)	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	良好に生育、バンブー (2 g c) キャメル (3 i e) 豊富に着生、アッシュ (5 f e) 生産しない
チロシン寒天 培地 (I S P)	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	良好に生育、バンブー (2 g c) ライトマスター・ド・タン～モスグリーン (2 i e～241 g) 豊富に着生、アラバスター・ティント (13 b a) 生産しない
オートミール 寒天培地 (I S P)	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	中程度に生育、バンブー～ゴールデンイ エロー (2 f b～2 k b) バンブー～カバート・ブラウン (2 f b～21 i) 中程度に着生、アッシュ (5 f e) シトロン (1 g c)
酵母エキス・麦芽 エキス寒天培地 (I S P)	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	良好に生育、バンブー (2 g c) マスター・ド (21 e) 豊富に着生、パールグレイ (13 c b) オリーブ・イエロー (11 e)
栄養寒天培地	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	中程度に生育、バンブー (2 g c) ナギット・ゴールド (2 n c) 中程度に着生、アッシュ (5 f e) 生産しない

ペプトン・酵母エ キス鉄寒天培地 (I S P)	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	中程度に生育、ダルゴールド (2 n g) ライトマスターDタン (2 i e) 貧弱に着生、ホワイト (a) 生産ない
グルコース・硝酸 塩寒天培地 I S P)	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	中程度に生育、ライトマスターDタン (2 i e) マスターD (2 l e) 中程度に着生、ホワイト (a) ゴールド (1 1/2 l c)
グリセロール・リ ンゴ酸カルシウム 寒天培地	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	良好に生育、バンブー (2 g c) ライトホワイト～バンブー (2 e a～2 g c) 豊富に着生、パール (3 b a) シトロン (1 g c)
グルコース・ペプ トン寒天培地	生育 裏面 気菌糸 可溶性色素	中程度に生育、バンブー (2 g c) ライトホワイト～ゴールデンイエロー (2 e a～2 k b) 貧弱に着生、ホワイト (a) 生産しない

(3) 生理学的諸性質

(1) メラニン色素

(イ) チロシン寒天 陰性
 (ロ) ペプトン、イースト・鉄寒天 陰性

(ハ) グルコース・ペプトン・ゼラチン培地	陰性
(ニ) トリプトン・イースト液	陰性
(2) チロシナーゼ反応	陰性
(3) 硫化水素の生産	陰性
(4) 硝酸塩の還元	陽性
(5) ゼラチンの液化 (21~23°C)	陰性
(グルコース・ペプトン・ゼラチン培地)	
(6) スターチの加水分解	陽性
(7) 脱脂乳の凝固 (37°C)	陰性
(8) 脱脂乳のペプトン化 (37°C)	陽性
(9) 生育温度範囲	9~37°C
(10) 炭素源の利用性 (ブリーダム・ゴトリープ寒天培地)	
グルコース、アラビノース、キシロース、メリビオース、マンニトール 、ラムノース、フルクトース、イノシトールを利用する。 ラフィノース、シュクロースをやや利用する。	
(11) セルロースの分解	陰性
(4) 細胞壁組成	
細胞壁のジアミノピメリン酸LL型である。	
以上、本菌株の菌学的性状を要約すると次のとおりである。	
細胞壁中のジアミノピメリン酸はLL型である。栄養菌糸は各種寒天培地上でよく発達し、分断は観察されない。気菌糸の形態はらせん状で長い胞子鎖を形成する。胞子の表面はとげ状である。培養上の諸性質としては、栄養菌糸がブラウン系の色調を呈し、気菌糸はホワイトからグレイ系の色調を呈する。可溶性色素は酵母エキス・麦芽エキス寒天培地、オートミール寒天培地、グルコース・アスパラギン寒天培地、グリセロール・アスパラギン寒天培地、グルコース・硝酸塩寒天培地、グリセロール・リンゴ酸カルシウム寒天培地で緑黄色系の色素を生産する。	
これらの観察結果から本菌株は、ストレプトマイセス属に属する一菌株と同	

定し、ストレプトマイセス エスピー・WK-5344 (*Streptomyces* sp. WK-5344) と命名した。

本菌株は、ストレプトマイセス エスピー・WK-5344 (*Streptomyces* sp. WK-5344) として、茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在する工業技術院生命工学工業技術研究所に平成11年3月1日付でFERM BP-6668として寄託されている。

本発明の好ましい菌株として、WK-5344 物質生産菌について説明したが、菌の一般的性状として菌学上の性状はきわめて変異し易く、一定したものではなく、自然的あるいは通常行われる紫外線照射、X線照射または変異誘導体剤、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニン、エチルメタンスルホネートなどを用いる人工的変異手段により変異することは周知の事実であり、このような人工的変異株は勿論、自然変異株も含め、ストレプトマイセス属に属し、WK-5344 物質を生産する能力を有する菌株はすべて本発明に使用することができる。また、細胞融合、遺伝子操作などの細胞工学的に変異させた菌株もWK-5344 物質生産菌として包含される。

本発明のWK-5344 A物質及びWK-5344 B物質を製造するに当たっては、先ずストレプトマイセス属に属するWK-5344 物質生産菌が、適当な培地に培養される。本菌の培養においては、通常の真菌の培養方法が一般に提供される。培地としては微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらに必要に応じて無機塩などを含有させた栄養培地が用いられる。

上記の同化し得る炭素源としては、ブドウ糖、ショ糖、糖蜜、澱粉、デキストリン、セルロース、グリセリン、有機酸などが単独または組み合わせて用いられる。消化し得る窒素源としては、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、コーン・スティーブ・リカー、綿実粕、カゼイン、大豆蛋白加水分解物、アミノ酸、尿素などの有機窒素源、硝酸塩、アンモニウム塩などの無機窒素化合物が単独あるいは組み合わせて用いられる。

その他必要に応じてナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩などの無機塩、重金属塩類が添加される。さらに培地には、必要

に応じて、本菌の生育やWK-5344A物質及びWK-5344B物質の生産を促進する微量栄養素、発育促進物質、前駆物質を適当に添加してもよい。

培養は通常振とうまたは通気攪拌培養などの好気的条件下で行うのがよい。工業的には深部通気攪拌培養が好ましい。培地のpHは中性付近で培養を行うのが好ましい。培養温度は20～37°Cの範囲でも行い得るが、通常は24～30°C、好ましくは27°C付近に保つのがよい。培養時間は、液体培養の場合、通常3～6日間培養を行うと、本発明のWK-5344A物質及びWK-5344B物質が生成蓄積されるので、好ましくは培養中の蓄積量が最大に達したときに培養を終了すればよい。

これらの培養組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気量などの培養条件は使用する菌株の種類や外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるよう適宜調節、選択されることはいうまでもない。液体培養において、発泡があるときは、例えばシリコン油、植物油、界面活性剤などの消泡剤を適宜使用してもよい。

このようにして得られた培養物中に蓄積されたWK-5344A物質及びWK-5344B物質は、培養滤液または培養菌体中に含まれているので、培養滤液を必要に応じて濾過補助剤、例えばセライト、ハイフロースパーセル等を加えて濾過するか、または遠心分離して培養滤液と菌体とに分離し、培養滤液と菌体との有機溶媒抽出物を濃縮したものの中からWK-5344A物質及びWK-5344B物質を採取するのが有利である。

また、培養滤液からWK-5344A物質及びWK-5344B物質を採取するには、先ず培養滤液を酢酸エチル、酢酸ブチル、ベンゼンなどの非親水性有機溶媒で抽出し、抽出液を減圧濃縮して粗製の物質、WK-5344A物質及びWK-5344B物質が得られる。該粗製物質はさらに脂溶性物質の精製に通常用いられる公知の方法、例えばシリカゲル、アルミナなどの担体を用いるカラムクロマトグラフィーによるWK-5344A物質及びWK-5344B物質を分離精製することができる。

菌体からWK-5344A物質及びWK-5344B物質を採取するには、菌体を含水アセトン、含水メタノールなどの含水親水性有機溶媒で抽出し、得られた抽出液を減圧濃縮し、その濃縮物を酢酸エチル、酢酸ブチル、ベンゼンなどの非親水性有機溶媒で抽出し、得られた抽出液は、前記の培養液から得た抽出液と合わせて分離精製するか、あるいは前記と同じ方法によってWK-5344A物質及びWK-5344B物質を分離精製することができる。

次に、本発明のWK-5344A物質およびWK-5344B物質の理化学的性状について述べる。

[I] WK-5344A物質

(1) 分子式 : $C_{45}H_{30}N_3O_{13}Fe$ (高分解能FABマススペクトル (positive) で m/z 877, 1203 ($M+H$) が観察された) (計算値 877, 1206)

(2) 分子量 : 876 (FABマススペクトル (positive) より m/z 877 ($M+H$)⁺, 899 ($M+Na$)⁺ が観察された)

(3) 比旋光度 : $[\alpha]_D^{25} -3000^\circ$ ($c=0.01$ 、メタノール)

(4) 紫外部吸収スペクトル : メタノール中で測定した紫外部吸収スペクトルは第1図に示すとおりであり、280、305(肩)、440、490 nm付近に特徴的な吸収極大を示す。

(5) 赤外部吸収スペクトル : 臭化カリウム錠剤法で測定した赤外部吸収スペクトルは第2図に示す通りであり、 $\lambda_{max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3400、1728、1701、1597、1493、1385、1284、1207、1105に特徴的な吸収帯を有する。

(6) 溶媒に対する溶解性 : メタノール、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシドに可溶、水に不溶

(7) 塩基性、酸性、中性の区別 : 中性

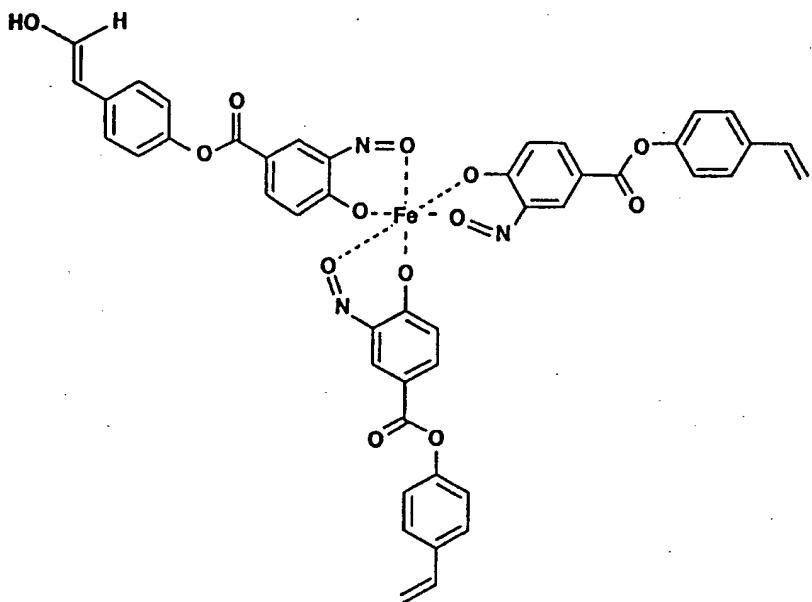
(8) 物質の色、形状 : 緑色粉末

(9) プロトン核磁気共鳴スペクトル : Varian社製、核磁気共鳴スペクトラメータを用いて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトル (重メタノール中で

測定、400MHz) は、第3図に示すとおり

(10) カーボン核磁気共鳴スペクトル: Varian社製、核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定したカーボン磁気共鳴スペクトル(重メタノール中で測定、100MHz) は、第4図に示すとおり

以上のように、WK-5344A物質の各種理化学的性状やスペクトルデータ詳細に検討した結果、WK-5344A物質は下記の式で表される化学構造であることが決定された。



[II] WK-5344B物質

(1) 分子式: C₄₆H₃₀N₃O₁₄Fe (高分解能FABマススペクトル (positive) でm/z 905, 1151 (M+H) が観察された) (計算値 905, 1155)

(2) 分子量: 904 (FABマススペクトル (positive) よりm/z 905 (M+H)⁺, 927 (M+Na)⁺が観察された)

(3) 比旋光度: [α]_D²⁵ -1000° (c=0.01、メタノール)

(4) 紫外部吸収スペクトル: メタノール中で測定した紫外部吸収スペクトルは第5図に示すとおりであり、285、303(肩)、445、698nm付近に特徴的な吸収極大を示す。

(5) 赤外部吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法で測定した赤外部吸収スペクトルは第6図に示す通りであり、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3400、1718、1701、1597、1508、1385、1281、1196、1105に特徴的な吸収帯を有する。

(6) 溶媒に対する溶解性：メタノール、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシドに可溶、水に不溶

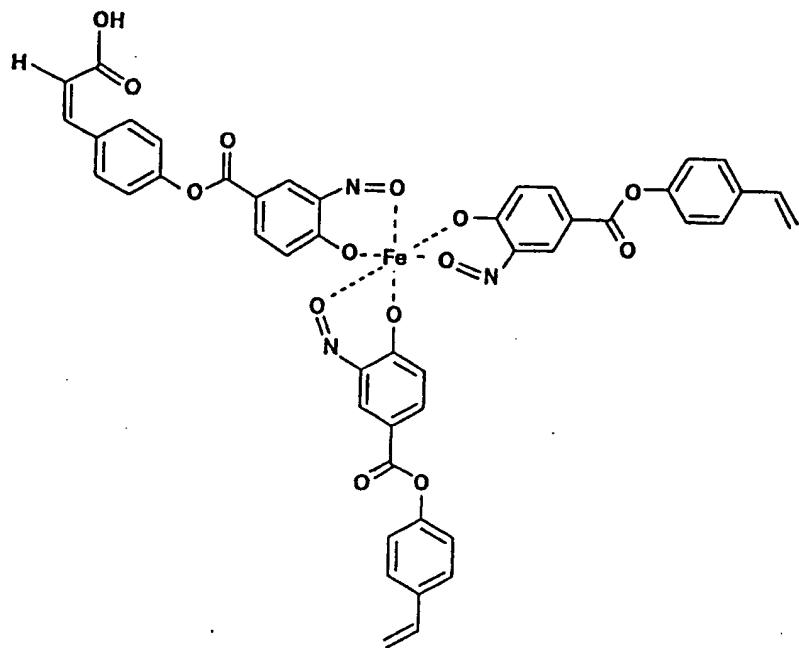
(7) 塩基性、酸性、中性の区別：中性

(8) 物質の色、形状：緑色粉末

(9) プロトン核磁気共鳴スペクトル：Varian社製、核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中で測定、400MHz）は、第7図に示すとおり

(10) カーボン核磁気共鳴スペクトル：Varian社製、核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定したカーボン核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中で測定、100MHz）は、第8図に示すとおり

以上のように、WK-5344B物質の各種理化学的性状やスペクトルデータ詳細に検討した結果、WK-5344B物質は下記の式で表される化学構造であることが決定された。



上記したように、WK-5344A物質及びWK-5344B物質の各種理化学的性状について詳述したが、このような性質に一致する化合物はこれまでに全く報告されておらず、WK-5344A物質及びWK-5344B物質は新規物質であると決定した。

本発明のWK-5344A物質及びWK-5344B物質の生物学的性質および阻害活性について以下に述べる。

(1) ヒト由来コレステリルエステル転送タンパク質に対する阻害作用

コレステリルエステル転送タンパク質に対する影響はひと血漿より調整した粗タンパク質を用いKatoら (Journal of Biological Chemistry 264巻 4082-4087、1989年) の方法に従った。

すなわち、[$1 - ^{14}\text{C}$]コレステリルエステルを含む再構成の高密度リポタンパク質 (High density lipoprotein; 以下HDLと称す) $25\ \mu\text{l}$ 、ヒト由来の低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein; 以下LDLと称す) $10\ \mu\text{l}$ 、7mMの5, 5-ジチオビスニトロ安息香酸 $30\ \mu\text{l}$ 、部分精製したヒトコレステリルエステル転送タンパク質 $5\ \mu\text{l}$ を合わせ、全部で $150\ \mu\text{l}$ の反応系で 37°C 、30分間反応させた。

反応後、0. 1%デキストラン硫酸 $5\ \mu\text{l}$ 、6mM MgCl₂ $5\ \mu\text{l}$ 、イオン強度0. 16に調整したリン酸緩衝液 $20\ \mu\text{l}$ を加え、氷上で20分間放置させた。続いて 4°C 、13000 rpm、15分間遠心し、LDLを沈殿画分として集め、0. 1N NaOH $180\ \mu\text{l}$ にLDLを溶解させ、LDLに転送されたコレステリルエステルの転送量を液体シンチレーションカウンターで測定した。本タンパク質によるコレステリルエステル転送活性を50%阻害する薬剤濃度を算定した結果は、WK-5344A物質では $0.54\ \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、WK-5344B物質では $2.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

以上のように、本発明のWK-5344A物質及びWK-5344B物質はコレステリルエステル転送タンパク質に対して著しい阻害活性を示すことから、

ヒトのコレステロール蓄積に起因する疾病の予防および治療に有用であると考えられる。

図面の簡単な説明

第1図は本発明のWK-5344A物質の紫外部吸収スペクトル（CH₃OH中）を示したものである。

第2図は本発明のWK-5344A物質の赤外部吸収スペクトル（KBr法）を示したものである。

第3図は本発明のWK-5344A物質のプロトン核磁気共鳴スペクトル（CD₃OD）を示したものである。

第4図は本発明のWK-5344A物質のカーボン核磁気共鳴スペクトル（CD₃OD）を示したものである。

第5図は本発明のWK-5344B物質の紫外部吸収スペクトル（CH₃OH中）を示したものである。

第6図は本発明のWK-5344B物質の赤外部吸収スペクトル（KBr法）を示したものである。

第7図は本発明のWK-5344B物質のプロトン核磁気共鳴スペクトル（CD₃OD）を示したものである。

第8図は本発明のWK-5344B物質のカーボン核磁気共鳴スペクトル（CD₃OD）を示したものである。

発明の実施の態様

次に、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれのみに限定されるものではない。

500ml容三角フラスコの濾粉2.4%、イーストエキストラクト0.5%、グルコース0.1%、ペプトン0.3%、肉エキス0.3%及びCaCO₃0.4%を含む培地（pH7.0に調整）100mlを仕込み、綿栓後、蒸気滅菌し、寒天培地上に生育させたストレプトマイセス エスピー（Strepto

myces s.p.) WK-5344 (FERM BP-6668) を白金耳にて無菌的に接種し、27°Cで72時間振盪培養して種培養液を得た。

一方、30リットル容ジャー・メンター1基に、可溶性澱粉4.0%、ハイプロトーストミール2.0%、チオ硫酸ナトリウム0.1N 32μl/リットル: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、KC1 0.03% (pH 6.5に調整) に仕込み、蒸気滅菌冷却後、種培養液200mlを無菌的に移植し、攪拌速度250rpm、通気量10リットル/分の培養条件下で27°Cで96時間通気攪拌培養した。

培養後、培養液より遠心分離して得られた菌体をアセトン6リットルで抽出した。抽出液を減圧濃縮してアセトンを除き、pH 5.0に調整後、酢酸エチル10リットルで抽出し、抽出液を減圧濃縮して粗製物9.20gを得た。この粗製物をヘキサン、メタノール、水(40:19:1)で分配させ、下層に分配されたWK-5344物質を集め、減圧濃縮して粗製物1.29gを得た。この粗製物をアセトニトリル10mlに懸濁し、ODS(20ml、センシュー社製、SSC-ODS-7515-12)のカラムにチャージし、0.05%リン酸を含むアセトニトリルで溶出するカラムクロマトグラフィーを行った。

各フラクションは12mlずつ分画し、活性成分を含むフラクションを集め、アセトニトリルを除いた後、水層画分を酢酸エチルで抽出し、それを減圧乾固して粗活性物質157mgを得た。

この157mgの粗活性物質をメタノール1.57mlに溶解し、ODS(147ml、センシュー社製、SSC-ODS-7515-12)のカラムにチャージし、0.05%リン酸を含むアセトニトリルで溶出するカラムクロマトグラフィーを行った。各フラクションは12mlずつ分画し、活性成分を含むフラクションを集め、アセトニトリルを除いた後、水層画分を酢酸エチルで抽出し、それを減圧乾固して粗活性物質19.5mgを得た。

19.5mgの粗活性物質をクロロホルム0.5mlに溶解し、シリカゲル(12.6ml、キーセルゲル60)のカラムにチャージし、クロロホルムとメタノールで溶出するカラムクロマトグラフィーを行った。各フラクションは12ml

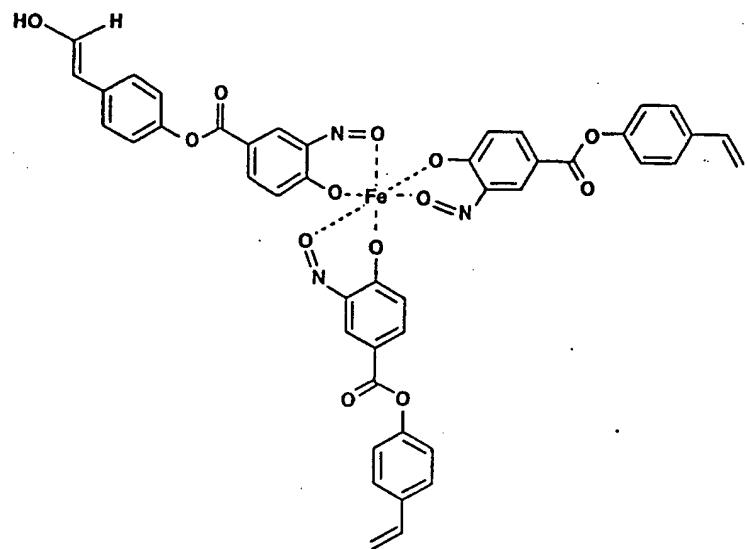
1ずつ分画した。その結果、WK-5344A物質1.69mgとWK-5344B物質1.12mgをそれぞれ単離した。

発明の効果

以上のとおり、ストレプトマイセス属に属するWK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養して、その培養物中にWK-5344A物質及びWK-5344B物質を蓄積せしめ、該培養物からWK-5344A物質及びWK-5344B物質を採取することにより、コレステリルエステル転送タンパク質阻害活性を有する物質が得られ、該物質は動脈硬化に基づく心筋梗塞や脳卒中などの成人病の予防、治療効果が期待される。

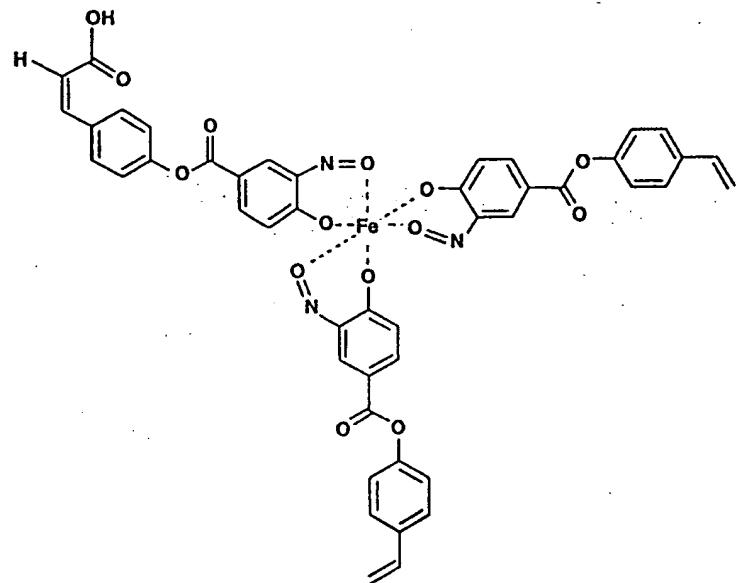
請求の範囲

1. 下記式



で表されるWK-5344A物質またはその塩。

2. 下記式



で表されるWK-5344B物質またはその塩。

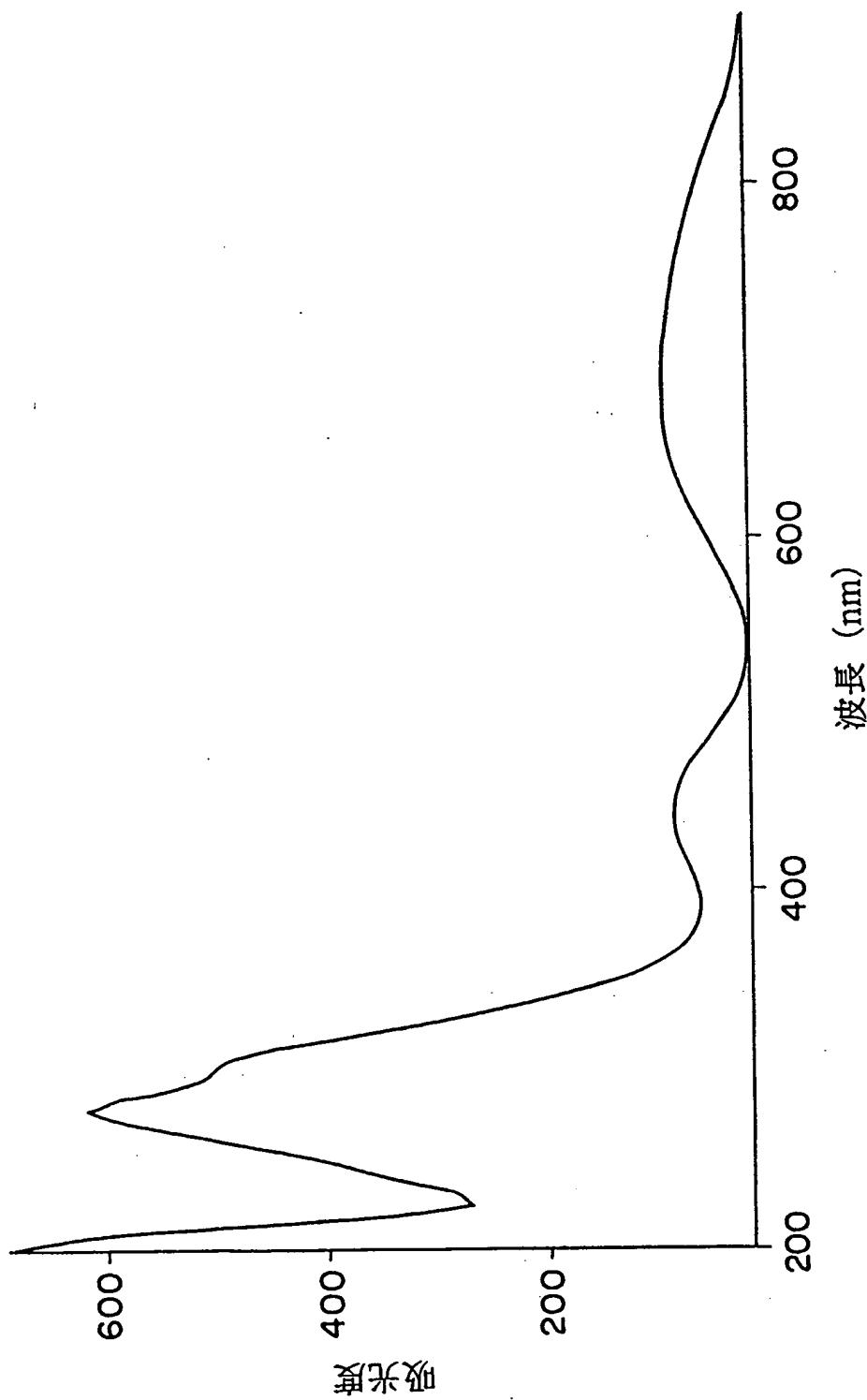
3. ストレプトマイセス属に属し、WK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養して、その培養物中にWK-5344A物質及びWK-5344B物質を蓄積せしめ、該培養物からWK-5344A物質及びWK-5344B物質を採取することからなるWK-5344A物質及びWK-5344B物質あるいはそれらの塩の製造法。

4. ストレプトマイセス属に属し、WK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトマイセス エスピー (*Streptomyces sp.*) WK-5344である請求の範囲第3項に記載の製造法。

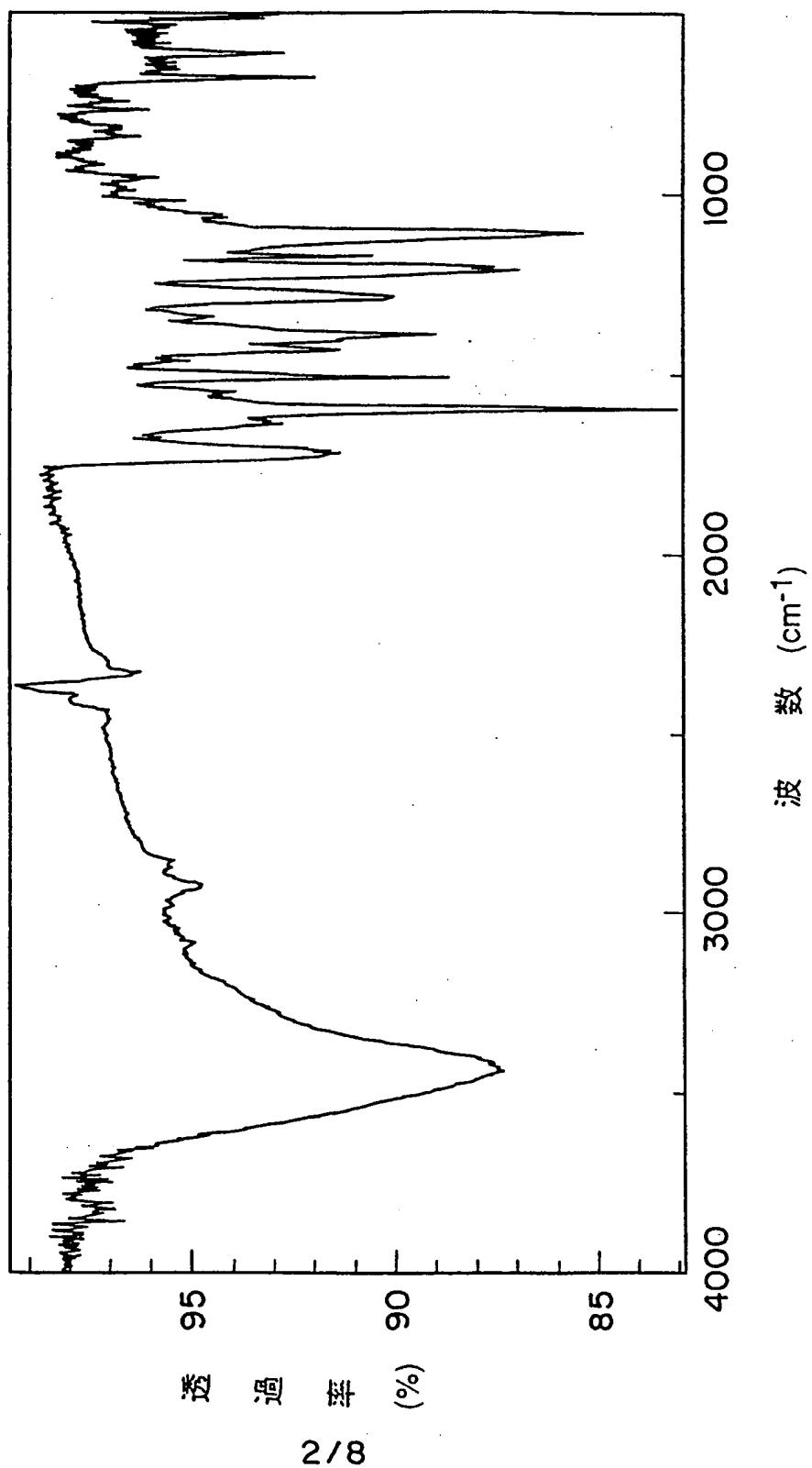
5. ストレプトマイセス属に属し、WK-5344A物質及びWK-5344B物質を生産する能力を有する微生物。

6. 微生物が、ストレプトマイセス エスピー (*Streptomyces sp.*) WK-5344 (FERM BP-6668) である請求の範囲第5項に記載の微生物。

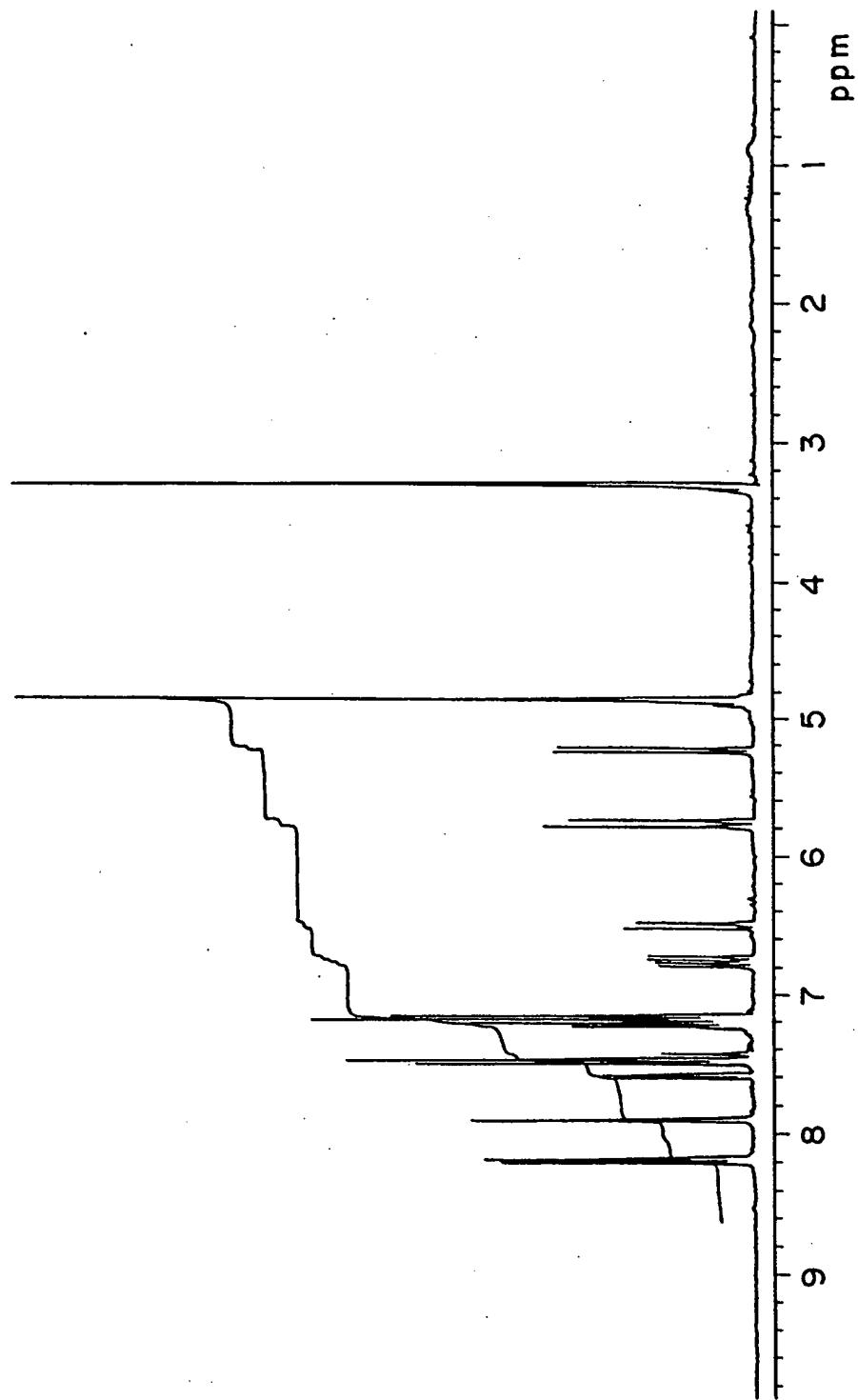
図一 第

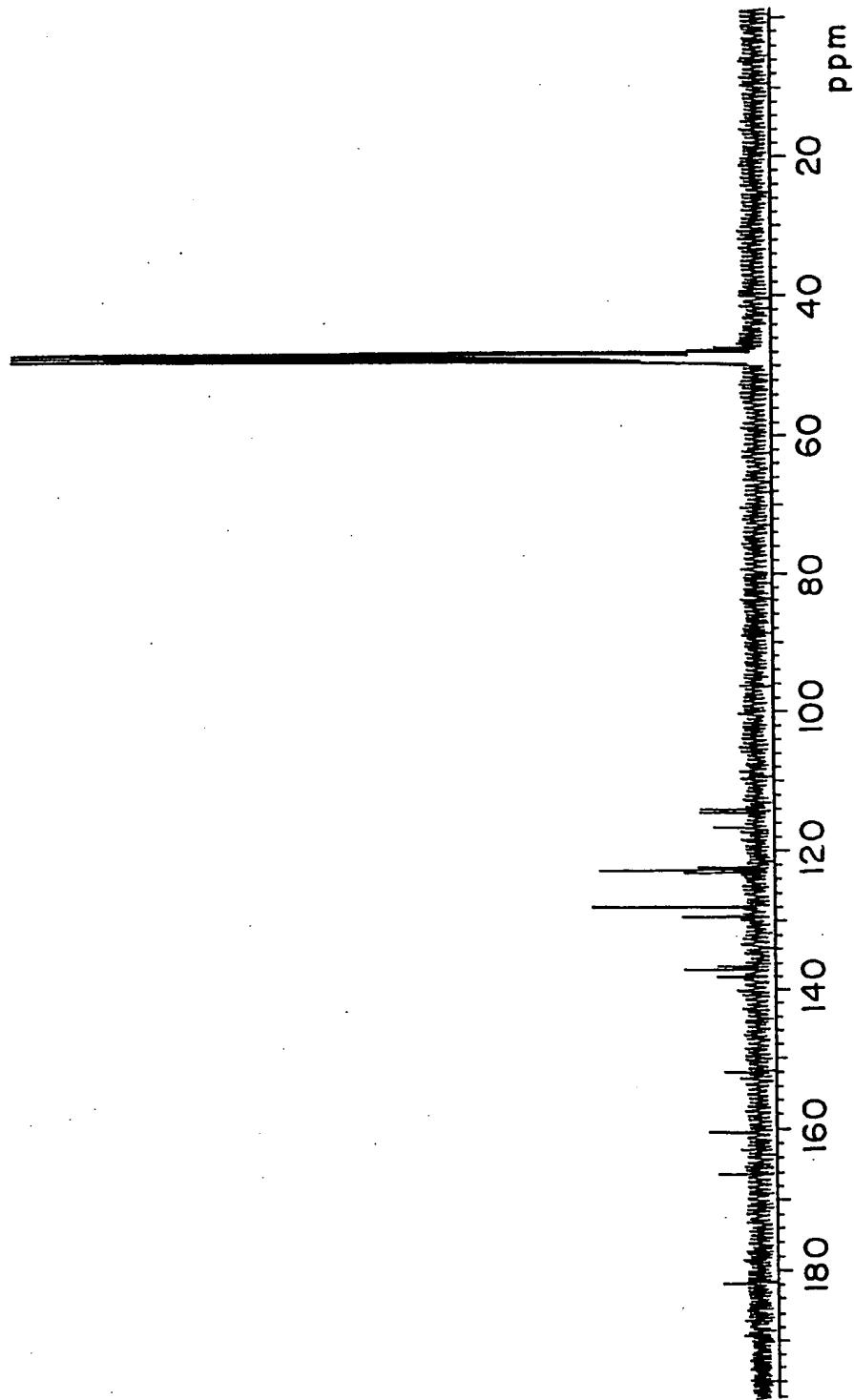


第2図



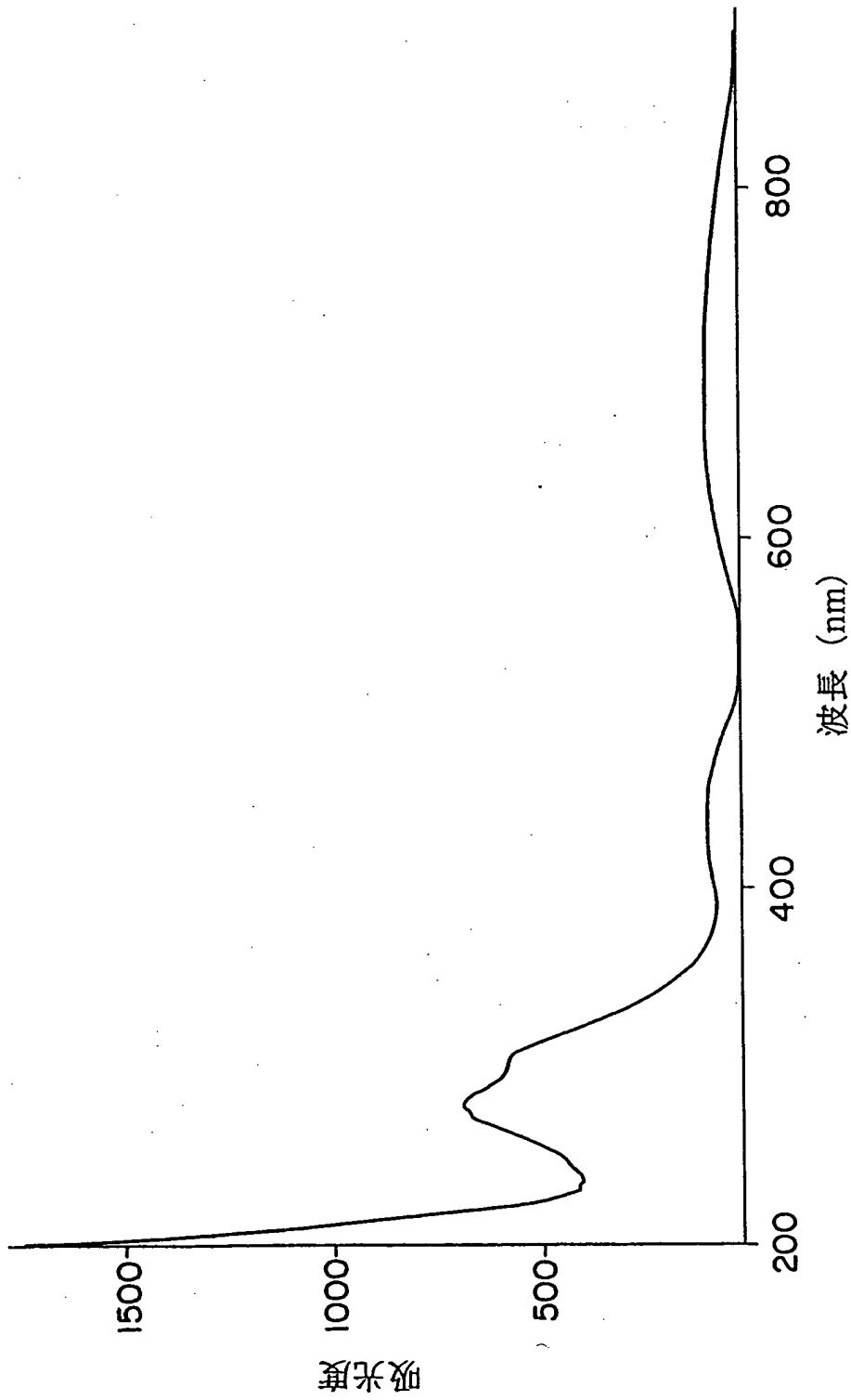
第3圖



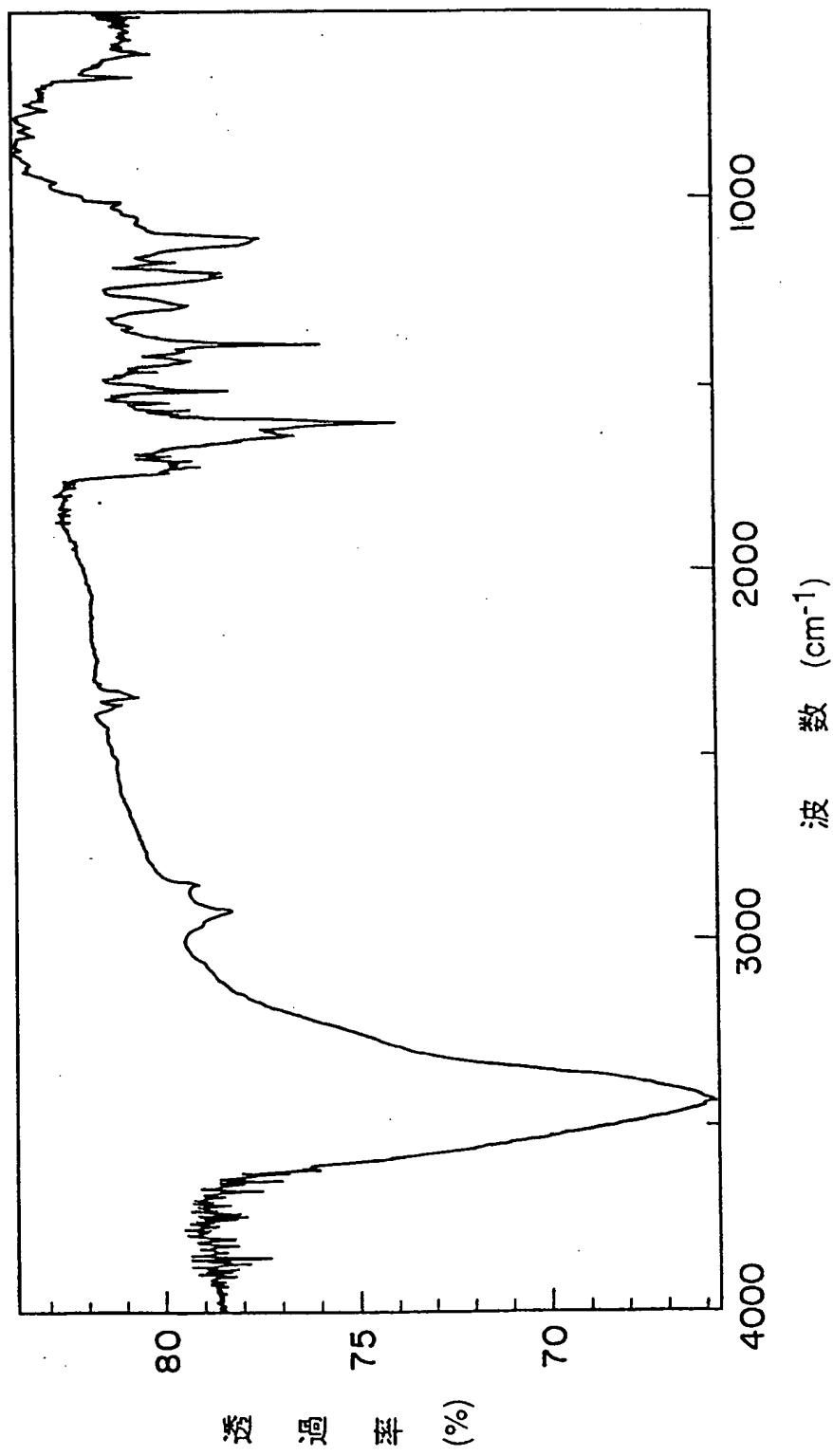


第4図

第5図

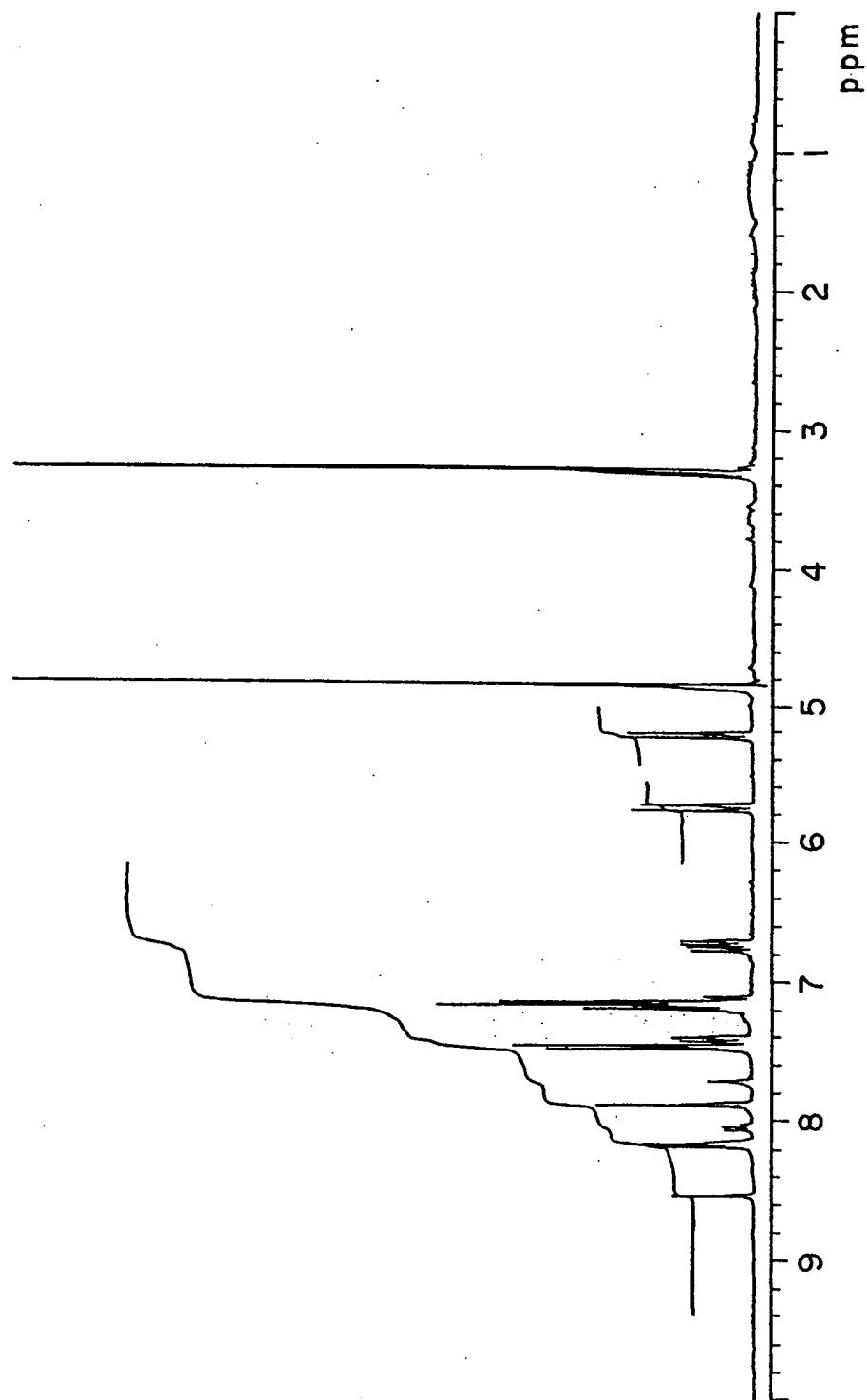


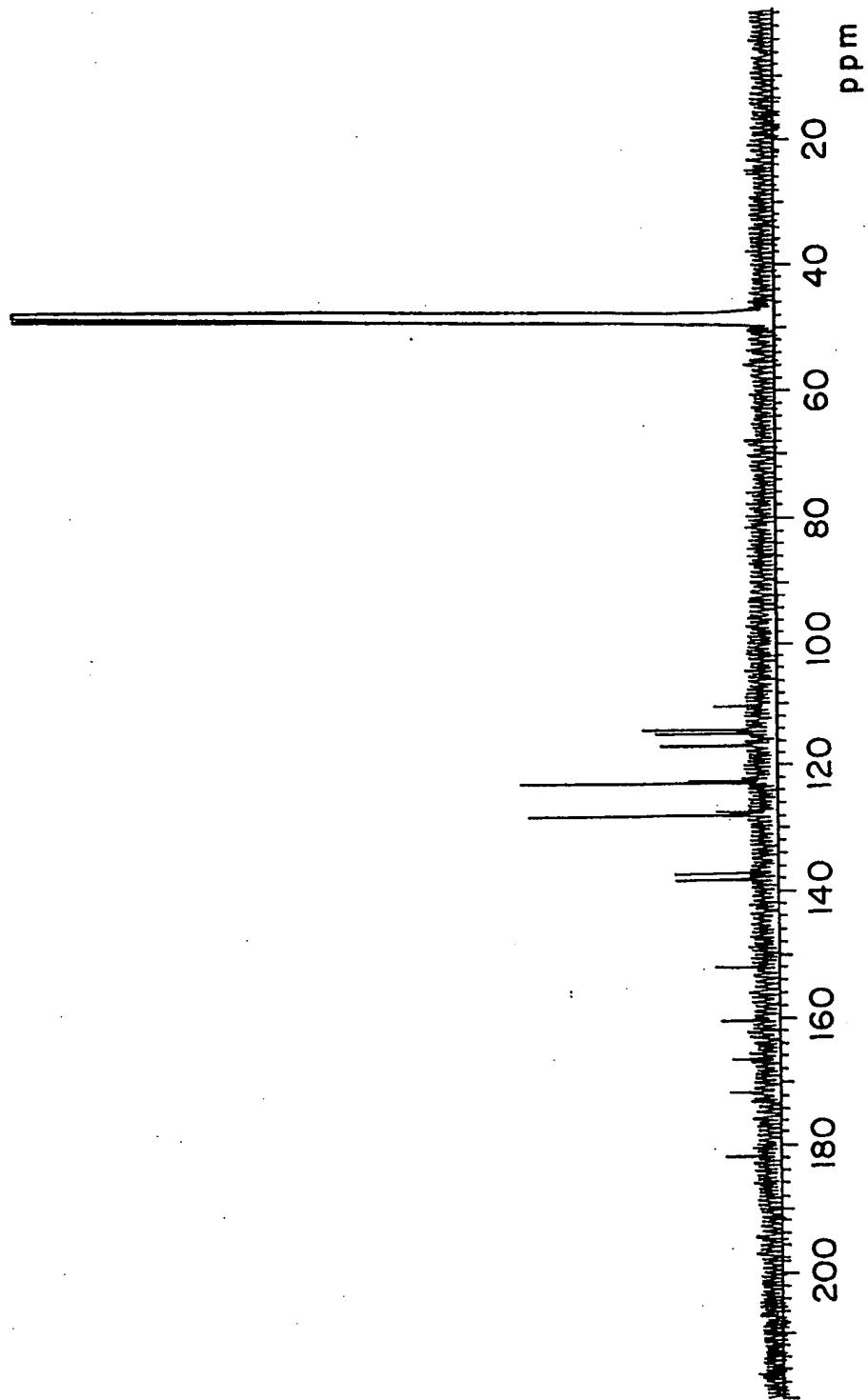
第6図



透 過 率 (%)

第7図





第 8 図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/01101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12P13/00, C12N1/20 // (C12P13/00, C12R1:465),
(C12N1/20, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12P13/00, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Endo A. "Compactin (ML-236B) and Related Compounds as Potential Cholesterol-Lowering Agents That Inhibit HMG-CoA Reductase" Journal of Medicinal Chemistry (1985) Vol. 28, No. 4, p.401-405	1-6
A	Endo A. "The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors" Journal of Lipid Research (1992) Vol. 33, p.1569-1582	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
6 May, 1999 (06. 05. 99)

Date of mailing of the international search report
18 May, 1999 (18. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01101

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. C1° C12P13/00, C12N1/20// (C12P13/00, C12R1:465),
 (C12N1/20, C12R1:465)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. C1° C12P13/00, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Endo A. "Compactin (ML-236B) and Related Compounds as Potentia-l Cholesterol-Lowering Agents That Inhibit HMG-CoA Reductase" Journal of Medicinal Chemistry (1985) Vol. 28, No. 4, p. 401-405	1-6
A	Endo A. "The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors" Journal of Lipid Research (1992) Vol. 33, p. 1569-1582	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.05.99

国際調査報告の発送日

18.05.99

国際調査機関の名称及び先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 N 9637

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488